

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

0 124 506
A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 84890074.2

(51) Int. Cl.³: **A 61 L 2/04**
// A61K35/16

(22) Anmeldetag: 28.04.84

(30) Priorität: 02.05.83 AT 1593/83
02.05.83 AT 1592/83
02.05.83 AT 1591/83
02.05.83 AT 1590/83

(71) Anmelder: IMMUNO Aktiengesellschaft für
chemisch-medizinische Produkte, Industriestrasse 72,
A-1220 Wien (AT)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung: 07.11.84
Patentblatt 84/45

(72) Erfinder: Philapitsch, Anton, Hans Kudlichgasse 5,
A-2490 Ebenfurt (AT)
Erfinder: Wöber, Günter, Prof. Dr., Carolusstrasse 23,
A-2522 Oberwaltersdorf (AT)
Erfinder: Elbl, Johann, Dr., Gustav Tschermakgasse 2,
A-1180 Wien (AT)
Erfinder: Schwarz, Otto, Dr., Celtesgasse 5, A-1190 Wien
(AT)

(64) Benannte Vertragsstaaten: AT BE CH DE FR GB IT LI NL
SE

(74) Vertreter: Wolfram, Gustav, Dipl.-Ing.,
Schwindgasse 7 P.O. Box 205, A-1041 Wien (AT)

(54) Verfahren zur Inaktivierung von vermehrungsfähigen Krankheitserregern.

(57) Es wird ein Verfahren zur Inaktivierung von vermehrungsfähigen Krankheitserregern, insbesondere Viren, in Präparationen, die Blutprodukte enthalten, beschrieben.

Die Präparationen werden nach Zusatz von Ammoniumsulfat bis zur Erreichung einer Salzkonzentration von mehr als 0,5 molar wärmebehandelt, und zwar bei einer Temperatur von 40 bis 121°C während einer Dauer bis zu 100 h, worauf das Ammoniumsulfat aus der Präparation entfernt wird. Die Inaktivierungswirkung wird gegenüber verschiedenen Modellviren, Poliomyelitis-Virus Typ I, Rotavirus und Cocksackie-Virus, veranschaulicht. Ebenso wird die nach der Inaktivierungsbehandlung noch vorhandene Aktivität der Blutprodukte dargestellt.

EP 0 124 506 A2

Verfahren zur Inaktivierung von vermehrungsfähigen
Krankheitserregern

- Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Inaktivierung von vermehrungsfähigen Krankheitserregern in Präparationen, die plasmatische Enzyme und Proenzyme, aktivierte oder nicht aktivierte Gerinnungsfaktoren, wie
- 5 Faktor II, V, VII, VIII, IX, X, XIII, "FEIBA" und Prothrombinkomplexpräparationen, plasmatische Inhibitoren, Immunglobuline oder sonstige Blutprodukte, wie Fibronectin und Fibrinogen, enthalten.
- 10 Aus der veröffentlichten europäischen Patentanmeldung O 018 561 ist es bekannt, Gerinnungsfaktoren enthaltende Präparationen, die praktisch fibrinogenfrei sind, gegen Hitzeeinwirkung zu stabilisieren, indem der Lösung der Gerinnungsfaktoren Aminosäure und ein
- 15 Mono-, Oligosaccharid oder Zuckeralkohol zugesetzt wird. Nach einer solchen Behandlung kann die Präparation 10 h bei 60°C erhitzt werden, wobei es bekannt ist, daß eine solche Behandlung bei Humanalbumin eine Inaktivierung von Hepatitisviren bewirkt. Das bekannte
- 20 Verfahren hat den Nachteil, daß die Ausbeute an den Gerinnungsfaktoren nicht zufriedenstellend ist. Weiters wurde das Verfahren gegenüber Modellviren nicht erprobt, so daß das Wirkungsspektrum dieser Stabilisierungsbehandlung auf verschiedene Krankheitserreger
- 25 unbekannt ist.

Nach der veröffentlichten europäischen Patentanmeldung O 052 827 ist des weiteren ein Verfahren zur

Herstellung einer Präparation der Gerinnungsfaktoren II und/oder VII bekannt geworden, welches hepatitis-sicher sein soll; das Verfahren besteht im Erwärmen der Präparation in Gegenwart einer Aminosäure, eines
5 Saccharids oder Zuckeralkohols und eines Chelatbildners, wie eines Salzes der Äthylen-diamino-tetra-essigsäure.

10 Gemäß dem Verfahren nach der veröffentlichten europäischen Patentanmeldung O 053 338 wird bei einem Verfahren zur Herstellung einer die Blutgerinnungs-faktoren IX und/oder X enthaltenden Präparation, die hepatitis-sicher sein soll, die Präparation in Gegen-wart einer Aminosäure, eines Saccharids oder Zucker-
15 alkohols und Ca-Ionen erwärmt, wobei den Ca-Ionen eine stabilisierende Wirkung gegen Hitzedenaturie-rung der Faktoren IX und X zugeschrieben wird.

In der veröffentlichten europäischen Patentanmeldung
20 O 035 204 ist weiters ein Verfahren zur Herstellung einer Proteinkomposition beschrieben, welches Ver-fahren darin besteht, daß die Komposition mit einem Polyol gemischt und die Mischung erhitzt wird, wäh-rend einer Dauer, die ausreicht, um die Proteinkompo-
25 sition zu pasteurisieren. Eine Modifikation dieses Verfahrens ist in der veröffentlichten europäischen Patentanmeldung O 065 256 beschrieben, wobei eine Lö-sung von Plasminogen, die gegebenenfalls eine Amino-säure, ein Saccharid oder einen Zuckeralkohol enthält,
30 in Gegenwart eines Proteinaseinhibitors erwärmt wird. Auch bei diesem Verfahren ist das Wirkungsspektrum der Behandlung nicht bekannt und die Ausbeute nicht zufriedenstellend.

35 Ein weiteres zum Stand der Technik gehörendes Verfah-ren ist in der US-PS 3,227,626 beschrieben, worin

eine Plasminogenlösung in Gegenwart von Lysin 10 h bei 60°C erhitzt wird, um die Präparation zu sterilisieren. Eine Wirksamkeit gegenüber einem bestimmten Virusspektrum ist auch dieser Literaturstelle nicht
5 zu entnehmen.

In einer weiteren Literaturstelle, nämlich Fed. Proc. Vol. 41, 1982, Abstract 2877, Seite 763, ist beschrieben, daß ein C₁-Inaktivator (C1-INA) enthaltendes
10 Konzentrat therapeutisch mit Vorteil verwendet werden kann, wenn es 10 h bei 60°C in Gegenwart von Kalium- oder Ammoniumcitrat erhitzt wird, wobei diese Behandlung das Risiko einer Hepatitisübertragung herabsetzt.

15 Ein ähnliches Verfahren ist auch aus Journal of Biological Chemistry, Vol. 256, 1981, Nr. 23, Seite 12140, zur Stabilisierung einer Antithrombin III-Präparation bekannt geworden.

20 Aus der DE-OS 31 02 217 ist weiters bekannt, ein Plasminogenpräparat mit einem physiologisch verträglichen anorganischen Salz, Lysin, Phenylmethansulfonylfluorid, Aprotinin oder Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor zu ver-
25 setzen, doch werden bei diesem bekannten Verfahren die zugesetzten Salze bzw. Inhibitoren nicht entfernt, sondern bleiben im Endprodukt, was die Aktivität der Präparationen und ihre Verträglichkeit vermindert.

30 Bei allen diesen Verfahren ist der Nachteil vorhanden, daß das Wirkungsspektrum der Behandlung nicht bekannt und die Ausbeuten nicht zufriedenstellend sind.

Die Erfindung bezweckt die Vermeidung der geschilderten Schwierigkeiten. Sie beruht auf der neuen Erkenntnis,
35 daß die Inaktivierung von Krankheitserregern in

biologischen und pharmazeutischen Medien von in
den Präparationen enthaltenen Proteinen gehemmt wird.
Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, diese Schutz-
wirkung der Proteine auf Krankheitserreger zu durch-
5 brechen bzw. zu überwinden, - unter gleichzeitiger
Erhaltung der biologischen Aktivität und der mole-
kularen Integrität der Proteine -, um auf diese Weise
sichere Blutprodukte-Präparationen zur Verfügung zu
stellen. Die zum Stand der Technik gehörenden Maßnah-
10 men haben diese Wirkung nicht. Im Gegenteil, einige
davon haben eine zusätzliche stabilisierende Wirkung
auf die Krankheitserreger.

Die Erfindung besteht bei einem Verfahren der eingangs
15 bezeichneten Art darin, daß die Präparation durch Zu-
satz von Ammoniumsulfat auf eine Salzkonzentration
von mehr als 0,5 molar gebracht und wärmebehandelt
wird, worauf das Salz aus der Präparation entfernt
wird.

20 Weitere Merkmale und bevorzugte Ausführungsformen des
erfindungsgemäßen Verfahrens sind in den Unteransprü-
chen angeführt.

25 Wie schon erwähnt, ist eine der Grundlagen, auf der
die Erfindung fußt, die Erkenntnis, daß die Schutz-
wirkung von Proteinen auf Krankheitserreger durch
Ammoniumsulfat und Wärmebehandlung aufgehoben wird.
Diese Tatsache ist in den folgenden Modellversuchen
30 am Beispiel verschiedener Viren veranschaulicht.

Versuch 1:

Poliomyelitis-Virus Typ I wurde einerseits in isotone
Kochsalzlösung, andererseits in eine 5 %ige Plasmapro-
35 teinlösung eingebracht. Die beiden mit Poliovirus ver-
setzten Lösungen wurden bei 45°C 10 Stunden erhitzt

und einer Virustiterbestimmung unterzogen. Die Werte in der folgenden Tabelle sind dekadische Logarithmen der $TCID_{50}$ pro 0,1 ml, wobei $TCID_{50}$ bedeutet, daß 50 % der Gewebekulturansätze einen cytopathischen Effekt zeigten.

	Virustiter nach 10stündiger Erhitzung bei 45°C
10 Virus in isotoner Kochsalzlösung	3,9
Virus in Plasmaproteinlösung	7,8

Der Versuch wurde mit dem gleichen Virus wiederholt, jedoch wurden beide Lösungen vor der Erhitzung mit Ammoniumsulfat (AMS) bis zur annähernden Salzsättigung versetzt (0,7 g Ammoniumsulfat pro ml), wobei ein pH-Wert von 7,3 resultierte. Nach 10stündiger Erhitzung bei 45°C wurde der Virustiter wie folgt bestimmt.

	Virustiter nach 10stündiger Erhitzung bei 45°C
25 Virus in AMS-hältiger isotoner Kochsalzlösung	4,0
Virus in AMS-hältiger Plasmaproteinlösung	< 3

Versuch 2:

30 Poliomyelitis-Virus Typ I, Rotavirus und Coxsackievirus wurden jeweils einer Plasmaproteinlösung mit einem Gehalt von 54 mg Protein/ml zugesetzt. Zu je 10 ml dieser mit Viren versetzten Plasmaproteinlösungen wurden 7 g Ammoniumsulfat zugefügt und der

35 pH-Wert auf 7,0 gestellt.

In Parallelversuchen wurden die virus- und ammonium-sulfathältigen Lösungen einmal während 10 Stunden auf 4°C gehalten und einmal während 10 Stunden auf 60°C erhitzt. Anschließend wurde das Salz aus den Proben durch Dialyse entfernt und eine Virustiterbestimmung vorgenommen. Die in der folgenden Tabelle angegebenen Werte sind dekadische Logarithmen der $TCID_{50}/0,1 \text{ ml}$.

	Virustiter	
	<u>10 h/4°C</u>	<u>10 h/60°C</u>
10 Poliomylitis-Virus		
Typ I + AMS in Plasma-		
proteinlösung	7,2	< 1
Rotavirus + AMS in		
15 Plasmaproteinlösung	9,0	< 1
Coxsackie-Virus + AMS		
in Plasmaproteinlösung	9,0	< 1

Das erfindungsgemäße Verfahren wird nun im Zuge von
 20 Herstellungsverfahren verschiedener Präparationen,
 die Blutprodukte enthalten, durch Beispiele näher er-
 läutert, wobei zur Veranschaulichung der Inaktivie-
 rungswirkung der erfindungsgemäß anzuwendenden Maßnah-
 men in einem bestimmten Stadium des Fraktionierungs-
 25 prozesses absichtlich Viren zugefügt wurden.

Beispiel 1:

46 l frisch gefrorenes Plasma wurden bei 0°C bis +4°C
 aufgetaut. Das entstandene Kryopräzipitat wurde durch
 30 Zentrifugieren abgetrennt und in 960 ml einer 0,1 %igen
 Tri-Natriumcitratlösung bei 37°C gelöst. Dieses Fak-
 tor VIII-hältige gelöste Kryopräzipitat wurde nach der
 in der US-PS 3,973,002 beschriebenen Methode auf einen
 pH-Wert von 6,0 bis 6,8 gestellt, wobei ein Nieder-
 35 schlag entstand, der durch Zentrifugieren abgetrennt
 und verworfen wurde. Diese Lösung wurde auf einen Faktor

VIII-Gehalt von 20 Einheiten/ml eingestellt und mit Poliomyelitis-Virus Typ I versetzt; sodann wurde Ammoniumsulfat (AMS) in einer Menge von 0,7 g/ml zugefügt und der pH-Wert auf 7,3 eingestellt. Dann wurde die Präparation in vier Teile geteilt und diese bei +4°C, 50°C, 55°C und 60°C während 10 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Virustiter bestimmt.

Die Ergebnisse sind aus der folgenden Tabelle zu er-
10 sehen.

	Behandlungs- temperatur	Virustiter
15 Faktor VIII-Präpara- tion + Virus + AMS	4°C	8
Faktor VIII-Präpara- tion + Virus + AMS	50°C	< 3
Faktor VIII-Präpara- tion + Virus + AMS	55°C	< 3
20 Faktor VIII-Präpara- tion + Virus + AMS	60°C	< 3

Man ersieht daraus, daß durch die erfindungsgemäße Salz- und Hitzebehandlung der Virustiter auf $< 10^3$
25 erniedrigt wurde.

Beispiel 2:

Einer wie in Beispiel 1 hergestellten Faktor VIII-Präparation, jedoch mit einem Proteingehalt von 7 mg/ml (2 E Faktor VIII/ml) wurde Poliomyelitis-Virus Typ I zugesetzt, dann Ammoniumsulfat in einer Menge von 0,8 g/ml zugefügt und diese Lösung während Zeiträumen von 2 Minuten, 6 Minuten, 20 Minuten, 3 Stunden und 10 Stunden bei 60°C wärmebehandelt.

35

Ein Parallelversuch wurde durchgeführt, bei welchem

jedoch vor dem Zusatz des Ammoniumsulfates Natrium-caprylat in einer Menge von 16 mMol/g Protein der Mischung zugefügt worden waren. Die Ergebnisse sind aus der folgenden Tabelle zu ersehen.

	Dauer der Wärmebehandlung bei 60°C	Virustiter einer Faktor VIII-Prä- paration + AMS	
		ohne Caprylat	mit Caprylat
5			
10	Ausgangswert	6,8	6,0
	2 Minuten	6,3	6,8
	6 Minuten	6,2	5,8
15	20 Minuten	5,7	<2,5
	60 Minuten	4,5	<2,5
	3 Stunden	<2	<2,5
	10 Stunden	<2	<2,5

20 Daraus ist ersichtlich, daß ohne Zusatz des Caprylates nach 3 Stunden eine deutliche Erniedrigung des Virus-titers stattfindet; mit Caprylatzusatz tritt diese Wirkung schon nach 20 Minuten ein.

25 In den folgenden Beispielen wird der weitere wichtige erfindungsgemäße Effekt, nämlich die Erhaltung der biologischen Aktivität der Faktor VIII-hältigen Prä-
parationen nach durchgeführter Salz- und Wärmebehand-
lung bei variierender Konzentration des Salzes veran-
30 schaulicht.

Beispiel 3:

Je 10 ml der in beschriebener Weise hergestellten
virushältigen Faktor VIII-Präparation mit 2 Einhei-
35 ten Faktor VIII/ml wurden mit je 6,4 g, 8,0 g, 9,6 g
Ammoniumsulfat versetzt. Der pH-Wert wurde auf pH 7,0

gestellt und die Mischungen solange gerührt, bis sich das Ammoniumsulfat vollständig gelöst hatte bzw. eine Sättigung von Ammoniumsulfat erreicht war. Die Lösungen wurden in ein Wasserbad gebracht und 10 Stunden bei 60°C erhitzt. Kontrollansätze mit dem gleichen Gehalt an Faktor VIII-Einheiten und gleichem Ammoniumsulfatgehalt wurden keiner Hitzebehandlung unterworfen. Alle Proben wurden einer Dialyse gegen NaCl-NaCitratlösungen mit je 6 g/l unterzogen, um das Ammoniumsulfat mit Hilfe einer semipermeablen Membran zu entfernen. Anschließend wurden an allen Proben eine Faktor VIII-Aktivitätsbestimmung (2-Stufentestmethode in "A Laboratory Manual of Blood Coagulation", D.E.G. Austen, I.L. Rhymes; Blackwell Scientific Publications 1975) und eine Virustiterbestimmung durchgeführt. Die Aktivitäten der hitzebehandelten Proben wurden mit den jeweils nicht hitzebehandelten ammoniumsulfatversetzten Kontrollansätzen verglichen und in % Restaktivität Faktor VIII ausgedrückt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle angeführt.

	Faktor VIII-Präparation mit	% Restaktivität Faktor VIII	Virustiter
	6,4 g AMS/10 ml	61	< 2
25	8,0 g AMS/10 ml	53	< 2
	9,6 g AMS/10 ml	87	< 2
	Kontrollproben		6,8

Es konnte in den mit AMS versetzten hitzebehandelten Proben keine Virusaktivität mehr nachgewiesen werden.

Beispiel 4:

Im folgenden Beispiel ist die Wirkung der erfindungsgemäßen Salz-Hitzebehandlung für verschiedene Proteinkonzentrationen gezeigt, wobei zu ersehen ist,

daß die Wirkung über einen äußerst weiten Konzentrationsbereich erzielt wird.

Eine Faktor VIII-hältige Präparation wurde wie beschrieben hergestellt. Der Proteingehalt dieser Faktor VIII-Präparation wurde mit einer 0,1 %igen Trisnatriumcitratlösung auf 1 mg Protein/ml bzw. 3 mg Protein/ml gestellt. Um eine Faktor VIII-hältige Präparation mit 100 mg Protein/ml herzustellen, wurde die beschriebene Faktor VIII-hältige Präparation mit einer hochkonzentrierten Plasmaproteinlösung (etwa 20 % Proteinlösung) versetzt, sodaß eine Faktor VIII-hältige Präparation mit 100 mg Protein/ml resultierte. Sodann wurde der Poliomyelitis-Virus, wie beschrieben, zugefügt.

Je 10 ml der Faktor VIII-hältigen Proteinlösung mit 1 mg bzw. 3 mg bzw. 100 mg Protein/ml wurden mit 8 g Ammoniumsulfat versetzt. Nach Lösen des Salzes wurden die Mischungen auf einen pH-Wert von 7,0 gestellt und 10 Stunden bei 60°C erhitzt. Anschließend wurde das Ammoniumsulfat mittels Dialyse entfernt und die Restaktivität des Faktors VIII der Proben gegenüber den unbehandelten Proben bestimmt.

	Faktor VIII + AMS 10 Stunden 60°C in einer	% Restaktivität Faktor VIII	Virustiter
	0,1 %igen Proteinlösung	13	< 3
30	0,3 %igen Proteinlösung	30	< 3
	10,0 %igen Proteinlösung	55	< 3

Beispiel 5:

In diesem Beispiel wird der Einfluß der Wärmebehandlung bei verschiedenen Temperaturen nach Zusatz von Ammoniumsulfat zu Faktor VIII-Präparationen gezeigt:

Je 10 ml der nach Beispiel 1 hergestellten virushältigen Faktor VIII-Präparation mit 2 E/ml wurden mit 7,2 g Ammoniumsulfat versetzt. Nachdem sich das Ammoniumsulfat gelöst hatte, wurde der pH-Wert auf 6,5
5 gestellt und die Mischungen während 10 Stunden bei variabler Temperatur erhitzt; die Entfernung des Ammoniumsulfats bzw. die Faktor VIII-Aktivitätsbestimmungen erfolgten wie in Beispiel 4.

10 Die Aktivitäten der Ammoniumsulfat-hitzebehandelten Proben wurden mit der Aktivität der unbehandelten Probe verglichen und in % Restaktivität ausgedrückt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle angeführt.

15

Behandlung bei	% Restaktivität F.VIII	Virustiter
45°C	100	<2
50°C	100	<2
55°C	90	<2
20 60°C	67	<2
62°C	67	<2
66°C	58	<2

Daraus ist ersichtlich, daß auch noch bei einer Temperatur von über 60°C die Restaktivität in einem hohen
25 Maße erhalten bleibt und das Virus inaktiviert wird.

Beispiel 6:

10 ml einer Faktor VIII-hältigen virushältigen Präparation mit 2 E Faktor VIII/ml wurden mit 8 g Ammoniumsulfat versetzt. Nach Auflösung des Ammoniumsulfats wurde der pH-Wert auf 7,0 gestellt und die Mischung 3 Minuten bei 90°C erhitzt. Anschließend wurde Ammoniumsulfat mittels Dialyse entfernt und
30 das hitzebehandelte Präparat einer Faktor VIII-Bestimmung unterzogen. Die Aktivität wurde mit der

Aktivität der nicht behandelten Faktor VIII-hältigen Präparation verglichen und in % Restaktivität ausgedrückt.

- 5 So wurde festgestellt, daß auch bei einer relativ hohen Temperatur von 90°C die Restaktivität noch zu 35 % erhalten blieb und der Virus seine Aktivität verliert. Der Virustiter ist $<10^3$.
- 10 Beispiel 7:
In diesem Beispiel wird die pH-Abhängigkeit im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens dargestellt.

Je 10 ml einer Faktor VIII-hältigen virushältigen
15 Präparation mit 7 mg/l Protein und 2 E Faktor VIII/ml wurden mit je 7,2 g Ammoniumsulfat versetzt. Nach Auflösung des Salzes wurden die pH-Werte der einzelnen Mischungen wie folgt gestellt: pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 10,0. Die so pH-gestellten Proben wur-
20 den 10 Stunden bei 60°C erhitzt. Anschließend erfolgte die Entfernung des Ammoniumsulfats mittels Dialyse und eine Faktor VIII-Bestimmung, die als % Restaktivität sich auf die unbehandelte Faktor VIII-hältige Probe ausdrückt und eine Virustiterbestimmung.

25

	pH 6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	10,0
Virustiter	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
% Restaktivität							
Faktor VIII nach							
30 10 h 60°C mit							
Ammoniumsulfat	65	60	65	55	60	35	25

Im nächsten Beispiel wird der Einfluß eines Glycin-
35 zusatzes zu einer Faktor VIII-hältigen Fraktion veranschaulicht.

Beispiel 8:

- 37 l frisch gefrorenes Plasma wurden bei 0°C bis +4°C aufgetaut. Das entstandene Faktor VIII-hältige
- 5 Kryopräzipitat wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und mit 400 ml einer 0,1 %igen Trinatriumcitratlösung bei 37°C gelöst. Die Lösung enthielt 66 mg Protein und 22 E Faktor VIII/ml. Der Lösung wurde ein Polio-
- 10 myelitis-Virus Typ I zugesetzt.
- Je 10 ml dieser Faktor VIII- und virushältigen Proteinlösung wurden
- a) mit 8 g Ammoniumsulfat versetzt, der pH-Wert auf 7 eingestellt und die Lösung 10 Stunden bei 60°C
- 15 erhitzt;
- b) mit 0,05 g Glycin und 8 g Ammoniumsulfat versetzt, der pH-Wert auf 7 eingestellt und die Lösung 10 Stunden bei 60°C erhitzt;
- c) mit 0,1 g Glycin und 8 g Ammoniumsulfat versetzt,
- 20 der pH-Wert auf 7 eingestellt und die Lösung 10 Stunden bei 60°C erhitzt;
- d) mit 0,5 g Glycin und 8 g Ammoniumsulfat versetzt, der pH-Wert auf 7 eingestellt und die Lösung 10 Stunden bei 60°C erhitzt.
- 25 Anschließend wurde Ammoniumsulfat mittels Dialyse entfernt und die % Restaktivität Faktor VIII der hitzebehandelten Proben gegenüber den unbehandelten Proben bestimmt, ebenso der Virustiter bestimmt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle angeführt.

Glycingehalt der Faktor VIII-Prä-
parationen

	ohne Glycin	0,5 % Glycin	1 % Glycin	5 % Glycin
5 Virustiter	<2	<2	<2	<2
% Restaktivität				
Faktor VIII nach				
AMS - 10 Stunden				
60°C	15	23	39	69

10

Beispiel 9:

2 ml einer in beschriebener Weise hergestellten Faktor VIII-Präparation mit einem Proteingehalt von 38 mg und 29,5 E Faktor VIII/ml wurden mit 1,6 g Ammoniumsulfat versetzt und der pH-Wert auf 7,0 gestellt und die Mischung aus Niederschlag und Lösung gefriergetrocknet. Die lyophilisierte Probe wurde 10 Stunden bei 60°C erhitzt, mit Wasser rekonstituiert, einer Dialyse unterworfen und schließlich eine Faktor VIII-Aktivitätsbestimmung vorgenommen. Die Faktor VIII-Restaktivität betrug gegenüber einer nicht hitztebehandelten Kontrollprobe 34 %.

Beispiel 10:

25 Frisch gefrorenes menschliches Citratplasma wird aufgetaut und das dabei anfallende Kryopräzipitat abgetrennt. Dem Kryoüberstand wird DEAE-Sephadex zugesetzt und während einer Kontaktzeit von 12 Stunden wird die FEIB-(Factor-Eight-Inhibitor-Bypass)-Aktivität gemäß der DE-OS 31 27 318 generiert. Alle Gerinnungsfaktoren inklusive FEIBA werden sodann vom DEAE-Sephadex mit einem Puffer eluiert. Nach einem Lyophilisationsschritt steht ein Bulkmaterial zur Verfügung. Von diesem Pulver werden 312 mg mit 10 ml H₂O gelöst. Diese Lösung enthält 20 mg Protein, 24 E FEIBA und 28 E Faktor VII/ml.

Zur Veranschaulichung der Inaktivierungswirkung der erfindungsgemäß anzuwendenden Maßnahmen wurde nun diesem Produkt absichtlich ein Virus, nämlich ein Virus von Poliomyelitis Typ I zugefügt. Sodann wurde
 5 zu einer Probe des virusversetzten Produktes Ammoniumsulfat (AMS) in einer Menge von 0,8 g/ml zugefügt, während eine Kontrollprobe salzfrei blieb. Beide Proben wurden auf pH 7 gestellt. Die salzhaltige Probe wurde 10 Stunden bei 60°C erhitzt und anschließend bei beiden Proben der Virustiter bestimmt.
 10 Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle angeführt.

		Virustiter	
		Probe nach AMS	Unbehandelte Kontrollprobe (+4°C)
15	Präparation enthaltend die Faktoren II, VII, IX,		
20	X, FEIBA	< 2,5	7,1

Die erfindungsgemäß kombinierte Salz-Hitze-Behandlung bewirkt nicht nur eine zuverlässige Inaktivierung von Krankheitserregern, wie Viren, sondern ein
 25 ebenso bedeutsamer Effekt ist die Erhaltung der biologischen Aktivität und der molekularen Integrität der Proteine. Um dies zu zeigen, wurde die wie im vorhergehenden beschriebene FEIBA-Präparation der Gerinnungsfaktoren einer Aktivitätsbestimmung vor
 30 und nach der Salz-Hitze-Behandlung unterzogen, wobei das AMS durch Dialyse entfernt wurde. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach den in der genannten DE-OS 31 27 318 beschriebenen Methoden. Die Ergebnisse sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

F.II F.VII F.IX F.X FEIBA

Restaktivität nach
der AMS-Hitze-Be-
handlung, 0,8 g AMS/ml

5	10 h 60°C	61	43	41	27	39
---	-----------	----	----	----	----	----

Beispiel 11:

Entsprechend der in Vox.Sang. 33, S. 37 - 50 (1977)
beschriebenen Methode wurden die Gerinnungsfaktoren

10 II, IX und X aus menschlichem Plasma über eine Ad-
sorption an DEAE-Sephadex, eine Waschung des An-
ionenaustauschers und eine Elution des partiellen
Prothrombinkomplexes gewonnen. Das Eluat wurde einem
Dialyse- und Gefriertrocknungsprozeß unterworfen.
15 Von diesem Bulkpulver wurden 467 mg mit 10 ml H₂O
gelöst. Diese Lösung enthielt 35 mg Protein, 70 E Fak-
tor II, 52 E Faktor IX und 61 E Faktor X/ml und stellte
somit eine Präparation eines partiellen Prothrombin-
komplexes dar.

20

Wie vorher beschrieben, wurde der Präparation Polio-
myelitis-Virus Typ I zugefügt und die Präparation mit
AMS einer 10stündigen Hitzebehandlung bei 60°C unter-
worfen. Anschließend erfolgte die Virustiterbestim-
25 mung und nach einer Dialyse die Bestimmung der Akti-
vität der Gerinnungsfaktoren. Die Ergebnisse sind in
der folgenden Tabelle angeführt.

		<u>Virustiter</u>	
30		Probe nach AMS	unbehandelte
		Hitzeinaktivierung	Kontrollprobe
			<u>(+4 °C)</u>
	Präparation enthaltend		
	partiellen Prothrombin-		
35	komplex	< 2,5	6,6

% Restaktivität nach AMS-Hitze-

Behandlung

Aktivität	Faktor II	IX	X
-----------	-----------	----	---

0,8 g AMS/ml,

5 10 h 60°C

66	39	28
----	----	----

Beispiel 12:

Entsprechend der in der AT-PS 359,646 beschriebenen Methode wurde eine Gerinnungsfaktor VII enthaltende

- 10 Präparation aus menschlichem Citratplasma hergestellt. Nach Abtrennung des Kryopräzipitates und einer DEAE-Sephadex-Behandlung wurde Faktor VII an $Al(OH)_3$ adsorbiert. $Al(OH)_3$ wurde einem Waschprozeß und einem Faktor VII-Elutionsprozeß bei erhöhter
- 15 Ionenstärke unterworfen. Das Faktor VII-hältige Eluat wurde dialysiert und lyophilisiert. 192 mg des Bulkpulvers wurden mit 10 ml H_2O gelöst. Diese Lösung enthielt 10,3 mg Protein und 21 E Faktor VII/ml. Wie vorher beschrieben, wurde auch hier absichtlich
- 20 Poliomyelitis-Virus Typ I zugefügt und die Präparation mit AMS einer 10stündigen Hitzebehandlung bei 60°C unterworfen. Anschließend erfolgte die Virus-titerbestimmung und nach einer Dialyse die Bestimmung der Aktivität der Gerinnungsfaktoren. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle angeführt.
- 25

Virustiter

Probe nach AMS-	unbehandelte
Hitzeinaktivierung	Kontrollprobe
	(+4°C)

30

Präparation enthaltend Faktor VII

<3

7,5

% Restaktivität nach AMS-Hitze-
Behandlung

Aktivität Faktor VII

0,8 g AMS/ml
5 10 h 60°C 58

Beispiel 13:

Eine Antithrombin III-Präparation wurde nach der in
"Thrombosis Research 5, S. 439 (1974)" beschriebenen
10 Methode affinitätschromatographisch über Heparin-
Agarose aus humanem Plasma hergestellt und lyophi-
lisiert. 530 mg dieses Antithrombin III-hältigen
Bulkmaterials wurden in 10 ml Wasser gelöst. Diese
Lösung enthielt 26 mg Protein und 25 E Antithrom-
15 bin III pro ml.

Die Präparation wurde sodann mit Poliomyelitis-
Virus Typ I versetzt. Dann wurde der Präparation
Ammoniumsulfat in einer Menge von 0,8 g/ml zugefügt
20 und der pH-Wert auf 7 gestellt. Dann wurde die Probe
10 Stunden bei 60°C erhitzt, das Salz durch Dialyse
entfernt und der Virustiter und die Aktivität des
Antithrombin III in der Präparation amidolytisch
gemessen. Die Bestimmungsmethode ist in Thrombosis
25 Research 6, S 287, 1975, beschrieben. Die Restakti-
vität wird in % gegenüber einer unbehandelten Probe
ausgedrückt.

In der folgenden Tabelle sind die Virustiter in
30 dekadischen Logarithmen der TCID₅₀/0,1 ml ausgedrückt;
die Restaktivität in Prozent.

	Virustiter		Restaktivität
	10 h/60°C		%
	<hr/> ohne AMS mit AMS <hr/>		
35 Antithrombin III-Prä- paration	6,9	<2,5	71

Beispiel 14:

Eine C_1 -Esterase-Inhibitor-Präparation wurde nach der in Vox. Sang. 26, S. 118 (1974) beschriebenen Methode aus humanem Plasma über Anionenaustauscher (DEAE-Sephadex) durch Adsorption und anschließende Elution gewonnen. Nach einer Salzfällung zur Abtrennung unerwünschter Proteine wurde die gereinigte C_1 -Inhibitor-Präparation gefriergetrocknet. 650 mg des C_1 -Inhibitor-hältigen Bulkmaterials wurden mit 10 ml Wasser gelöst. 1 ml dieser Lösung enthielt 49 mg Protein und 60 E C_1 INA.

Die Lösung wurde mit Poliomyelitis-Virus Typ I beimpft und sodann in erfindungsgemäßer Weise behandelt, indem 0,8 g Ammoniumsulfat/ml zugefügt, der pH-Wert auf 7 gestellt und die Probe 10 Stunden bei 60°C erhitzt wurde. Nach Entfernung des Ammoniumsulfates mittels Dialyse wurde eine Virustiterbestimmung vorgenommen und die Restaktivität des C_1 -Inhibitors mit chromogenem Substrat nach der in "Mikrozirkulation und Prostaglandinstoffwechsel", Verhandlungsbericht der 25. Tagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Blutgerinnungsforschung in München, Februar 1981, S 221, F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart - New York, beschriebenen Methode festgestellt.

In der folgenden Tabelle sind die Virustiterwerte, angegeben in dekadischen Logarithmen der $TCID_{50}/0,1$ ml, und die Restaktivität in % gegenüber einer unbehandelten Probe angegeben.

	Virustiter		Restaktivität
	10 h/60°C		%
	ohne AMS mit AMS		
C_1 -Esterase-Inhibitor-Präparation	6,9	< 2,5	85

Beispiel 15:

In diesem Beispiel wird der Einfluß der erfindungsge-
mäßigen Behandlung an einer Plasmapräparation demon-
striert. Plasma wurde mit Poliomyelitis-Virus Typ I
5 versetzt, Ammoniumsulfat in einer Menge von 0,8 g/ml
zugefügt, der pH-Wert auf 7 gestellt und die Probe
einer Hitzebehandlung während 10 Stunden bei 60°C,
65°C und 75°C unterworfen. Anschließend wurde das
Ammoniumsulfat durch Dialyse entfernt, der Virus-
10 titer bestimmt und die Trypsin-Inhibition gemessen.

In der folgenden Tabelle sind die Virustiterwerte in
dekadischen Logarithmen der TCID₅₀/0,1 ml angegeben
und die Trypsin-Inhibition als % Restaktivität gegen-
15 über einer unbehandelten Kontrolle zum Ausdruck ge-
bracht.

		Virustiter			% Restaktivität an			
		10 h			Trypsin-Inhibition			
20		Kontrolle	60°C	65°C	75°C	60°C	65°C	75°C
	Plasma + AMS		<2,5	<2,5	<2,5	62	62	53
	Plasma ohne AMS	7						

Die Methode der Bestimmung der Restaktivität besteht
25 darin, daß 86,4 mg Trypsin (Pankreasprotease Merck
Art. Nr. 8367) in 100 ml 10⁻³n HCl gelöst werden.
Diese Trypsinlösung wird mit der zu bestimmenden Pro-
be gemischt, wobei die im Plasma vorhandenen Trypsin-
inhibitoren das zugesetzte Trypsin neutralisieren.
30 Nicht neutralisiertes Trypsin wird amidolytisch mit
chromogenem Substrat Bz-Ileu-Glu-Gly-Arg-pNA ge-
messen. Die verbliebene, nicht neutralisierte Tryp-
sinmenge wird auf einen Trypsinleerwert, bei dem
keine Probenzugabe erfolgte, bezogen. Sie stellt ein
35 indirektes Maß für die Trypsininhibitoren dar.

Beispiel 16:

Eine Immunglobulin-Präparation wurde nach der Alkoholfraktionierungsmethode nach Cohn (Cohn Fraktion II) aus menschlichem Plasma gewonnen. Die Lösung enthielt
 5 160 mg Protein mit einem Anteil von 97,3 % Gamma-globulin und 2,7 % α, β -Globuline, 22,5 mg Glycin und 3 mg NaCl pro ml.

Die Lösung wurde sodann mit einem Poliomyelitis-Virus
 10 Typ I versetzt. Sodann wurden zu der Probe 0,8 g Ammoniumsulfat/ml zugesetzt, der pH-Wert auf 7 gestellt und die Präparation 10 Stunden bei 60°C erhitzt. Anschließend wurde das Ammoniumsulfat mittels Dialyse entfernt und der Virustiter bestimmt.

15 Die Ergebnisse im Vergleich zu einer unbehandelten Probe sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich, wobei die angegebenen Werte die dekadischen Logarithmen der TCID₅₀/0,1 ml sind.

20

	Virustiter	
	10 h/4°C	10 h/60°C
	<u>ohne AMS</u>	<u>mit AMS</u>
Immunglobulin-		
25 präparation	5,7	<2,5

Um eventuelle Veränderungen an der erfindungsgemäß behandelten Immunglobulin-Präparation feststellen zu können, wurde an der mit Ammoniumsulfat und mit Hitze
 30 behandelten Probe eine elektrophoretische Auftrennung der Globuline vorgenommen, u. zw. auf einer Cellulose-Acetat-Membran bei einem pH-Wert von 8,6 und einer Ionenstärke von 0,075. Eine solche elektrophoretische Untersuchung ist in der AT-PS 368 883 beschrieben.

35

Die Ergebnisse der elektrophoretischen Auftrennung

sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich:

		% Protein	
		<u>α, β-Globuline</u>	<u>γ-Globuline</u>
5	Kontrolle ohne Hitze-		
	behandlung	2,7	97,3
	Probe mit AMS		
	10 h/60°C	2,9	97,1
10	Es ist somit ersichtlich, daß keine Veränderung gegenüber der unbehandelten Probe stattgefunden hat, daß also die Proteine in ihrer molekularen Integrität und Mobilität unverändert geblieben sind.		
15	Weiters wurde die erfindungsgemäß durch Ammonium-		
	sulfat und Hitze behandelte Präparation noch einem		
	Antikörpertitertest gegen Masern, Rubella und Per-		
	tussis unterzogen, um zu zeigen, daß während der AMS-		
	Hitzebehandlung die Wirkung der Antikörper erhalten		
20	bleibt. Es wurden Hämagglutinationshemmtests und ein		
	Agglutinationstitertest für die Bestimmung der Anti-		
	körper gegen Masern, Rubella bzw. Pertussis nach der		
	in American Journal of Hygiene <u>71</u> , S 120 (1960);		
	Journal Path. and Bact. <u>78</u> (1959); R. Trien in Re-		
25	cherches Immunologique 1965 Inst. Merieux beschrie-		
	benen Methode durchgeführt. Dabei wurde der Gehalt		
	an Virus-neutralisierenden Antikörpern bestimmt.		
	Viren rufen unter bestimmten Bedingungen eine Aggre-		
	gation von Erythrocyten hervor. Diese agglutinieren-		
30	den Eigenschaften der Virusantigene gehen durch die		
	Reaktion mit spezifischen Antikörpern verloren. Um		
	diesen Vorgang zu quantifizieren, wurde die Probe		
	verdünnt und jede Verdünnung mit derselben Menge		
	Virusantigen inkubiert. Der Endpunkt ist dann erreicht,		
35	wenn die Antikörper der Probe alle vorhandenen Anti-		
	gene gebunden haben und keine Agglutination mit Ery-		

throcyten eintritt. Die höchste Verdünnung, bei der diese Reaktion eintritt, ist der Endpunkt, wie in der folgenden Tabelle für Pertussis und Rubella angeführt. Bei Masernantikörper wird die Verdünnungs-
 5 stufe der Probe noch mit der des Internat. WHO-Standards verglichen und als Internationale Einheit ausgedrückt.

	Masern IE/ml	Antikörper	
		Pertussis Verdünnungs- stufe	Rubella Verdünnungs- stufe
10 Kontrolle	12	1 : 142	1 : 168
15 Immunglobulin AMS 10 h 60°C	12	1 : 142	1 : 200

Beispiel 17:

Eine Plasminogen-Präparation wurde nach der von D. G. Deutsch und E. T. Mertz in Science 170, 1095 (1970) beschriebenen Methode hergestellt. 50 ml Lysin-Sepha-
 20 rose wurden in einer Säule mit 0,1 M Phosphat, pH 7,4 äquilibriert. 340 ml Plasma wurden mit Wasser auf 640 ml verdünnt und die Säule wurde mit dieser
 25 Lösung beladen. Nach der Entfernung von Begleitproteinen durch Waschung mit einer 0,3 M Phosphatlösung (pH 7,4) wurde das Plasminogen mit 0,2 M 6-Aminocapron-
 säure (pH 7,4) eluiert. Die 6-Aminocapronsäure wurde durch Dialyse oder durch Gelfiltration über Sephadex
 30 G-25 entfernt und die Plasminogen-enthaltende Lösung wurde gefriergetrocknet.

230 mg dieses Bulkpulvers wurden in 10 ml Wasser gelöst. Diese Lösung enthielt 271 Casein-Einheiten
 35 Plasminogen und 13 mg Protein pro ml.

Die Präparation wurde, wie im vorhergehenden Beispiel beschrieben, mit Poliomyelitis-Virus Typ I versetzt, sodann wurden 0,8 g Ammoniumsulfat/ml zugefügt, der pH-Wert auf 7 gestellt und die Präparation sodann

5 10 Stunden bei 60°C erhitzt. Anschließend wurde Ammoniumsulfat durch Dialyse entfernt und der Virustiter sowie die Aktivität von Plasminogen mit Urokinase und einem chromogenen Substrat (H-D-Val-Leu-Lys-pNA) nach der Methode in "Chromogenic Peptide Substrates:

10 Chemistry and Clinical Usage", Edt. M. F. Scully, V. V. Kakkar, S. 128 (1979), Verlag Churchill Livingstone, bestimmt.

In der folgenden Tabelle ist der Virustiter und die

15 Restaktivität gegenüber unbehandelten Kontrollproben dargestellt, wobei die angegebenen Werte des Virustiters die dekadischen Logarithmen der TCID₅₀/0,1 ml sind.

	Virustiter		Restaktivität %
	10 h/4°C ohne AMS	10 h/60°C mit AMS	
20 Plasminogen- präparation	6,6	<2,5	55

25

Beispiel 18:

Eine C₁-Esterase-Präparation wurde nach der von D. H. Bing, J. M. Andrews, F. L. Suddath und R. Spencer, Prot. Biol. Fluids 23 551 (1975), Ed. H. Peeters,

30 beschriebenen Methode hergestellt.

1 l Plasma wurde mit einer 50 %igen Lösung von Polyäthylenglykol (PEG) auf eine Endkonzentration von 5 % PEG gefällt. Der Niederschlag wurde nach der Ab-

35 trennung durch Zentrifugation mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (Ionenstärke 0,005) gewaschen und

in 100 ml 0,5 M NaCl gelöst. Nach der Dialyse gegen isotone Kochsalzlösung, die 1 mMol/l CaCl_2 enthielt, wurde das clottierte Material entfernt. Eine 4 x 15 cm Säule wurde mit IgG-p-azobenzamidoäthylamino-
5 Sepharose 6B gepackt und mit isotoner Kochsalzlösung, die 1 mMol/l CaCl_2 enthielt, äquilibriert. Diese Säule wurde mit der wie oben beschrieben hergestellten Plasmafraktion beladen und mit dem Äquilibrierungspuffer proteinfrei gewaschen. Unspezifisch gebundene
10 Proteine wurden durch Waschung mit Borat-gepufferter Kochsalzlösung, die 1 mMol/l CaCl_2 enthielt, entfernt.

C_1 -Esterase wurde mit einem Puffer eluiert, der 2,5
15 mMol/l EDTA enthielt. Das Eluat wurde gegen eine Tris-gepufferte Kochsalzlösung dialysiert und gefriergetrocknet.

4,5 g dieses Bulkpulvers wurden in 10 ml Wasser gelöst. 1 ml der Lösung enthielt 13,5 mg Protein.
20

Die Aktivität des Enzyms, bestimmt mit chromogenem Substrat (Pyroglutamyl-Gly-Arg-pNA), wurde amidolytisch gemessen und betrug 78,1 nmol pNA.ml⁻¹.min⁻¹ (Bestimmungsmethode gemäß "Mikrozirkulation und Prostaglandinstoffwechsel", 25. Tagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Blutgerinnungsforschung in München, Februar 1981, S. 221, F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart-New York.
25

30

Die erhaltene Präparation mit den angegebenen Eigenschaften wurde sodann mit Poliomyelitis-Virus Typ I beimpft und sodann gemäß der Erfindung mit 0,8 g Ammoniumsulfat/ml versetzt, der pH-Wert auf 7 gestellt und während 10 Stunden auf 60°C erhitzt. Nach
35 der Behandlung wurde, wie beschrieben, der Virus-

titer und die amidolytische Aktivität festgestellt.
In der folgenden Tabelle sind die Virustit rwerte
und die Restaktivität in % gegenüber einer unbehan-
delten Kontrolle angegeben, wobei die angegebenen
5 Werte des Virustiters die dekadischen Logarithmen
der $TCID_{50}/0,1$ ml sind.

	Virustiter		Restaktivität
	10 h/4°C	10 h/60°C	%
	ohne AMS	mit AMS	
10			
C_1 -Esterase			
Präparation	7,1	<2,5	63

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Inaktivierung von vermehrungsfähigen Krankheitserregern in Präparationen, die plasmatische Enzyme und Proenzyme, aktivierte oder nicht aktivierte Gerinnungsfaktoren, wie
5 Faktor II, V, VII, VIII, IX, X, XIII, "FEIBA" und Prothrombinkomplexpräparationen, plasmatische Inhibitoren, Immunglobuline oder sonstige Blutprodukte, wie Fibronectin und Fibrinogen, enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß die Präpara-
10 tion durch Zusatz von Ammoniumsulfat auf eine Salzkonzentration von mehr als 0,5 molar gebracht und wärmebehandelt wird, worauf das Salz aus der Präparation entfernt wird.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Präparation mit einem Proteingehalt von 0,001 bis 30 % eingesetzt wird.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Präparation mit einer 2- bis 4-molaren Ammoniumsulfatkonzentration wärmebehandelt wird.
- 25 4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß aus der Präparation durch Zusatz von Ammoniumsulfat ein protein- und salzhaltiger Niederschlag gewonnen und dieser der Wärmebehandlung unterworfen wird.
- 30 5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die ammoniumsulfathaltige Präparation gefriergetrocknet und das Lyophilisat der Wärmebehandlung unterworfen wird, worauf

durch Zusatz eines wässrigen Lösungsmittels zu dem Lyophilisat eine Lösung rekonstituiert und das Ammoniumsalz daraus entfernt wird.

- 5 6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Wärmebehandlung während einer Dauer von 1 Sekunde bis 100 Stunden und bei einer Temperatur von 40°C bis 121°C durchgeführt wird.
- 10 7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Wärmebehandlung als Schockbehandlung durchgeführt wird.
- 15 8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert der Präparation während der Behandlung in einem Bereich von 5 bis 11, vorzugsweise 6,5 bis 8,5, gehalten wird.
- 20 9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Präparation vor der Wärmebehandlung proteinstabilisierende Substanzen, wie Glycin, zugesetzt werden.
- 25 10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Präparation vor der Wärmebehandlung antimikrobielle Substanzen, wie Caprylate, zugesetzt werden.
- 30 11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Entfernung des Ammoniumsulfates aus der Präparation mit Hilfe von semipermeablen Membranen erfolgt.
- 35 12. Präparation, enthaltend plasmatische Enzyme und Proenzyme, aktivierte oder nicht aktivierte Gerinnungs-

faktoren, wie Faktor II, V, VII, VIII, IX, X, XIII,
"FEIBA" und Prothrombinkomplexpräparationen, plas-
matische Inhibitoren, Immunglobuline oder sonstige
Blutprodukte, wie Fibronectin und Fibrinogen, er-
5 hältlich nach den Ansprüchen 1 bis 11, durch Be-
handeln dieser mittels Ammoniumsulfat bei einer
Salzkonzentration von mehr als 0,5 molar sowie
durch Wärmebehandlung und Entfernung des Salzes
aus der Präparation und Haltbarmachen, insbeson-
10 dere durch Lyophilisieren.